

بررسی مارکر پلی مورفیک rs9384 واقع در ناحیه ژنی GCDH مرتبط با بیماری گلووتاریک اسید یوریک نوع ۱

زهرا بدر^{۱*}، زیور صالحی^۲، علی جزایری^۱، صادق ولیان بروجنی^۱

^۱گروه زیست شناسی، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران؛ ^۲گروه زیست شناسی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران.

تاریخ دریافت: ۹۴/۶/۲۹

تاریخ پذیرش: ۹۴/۱۰/۲

چکیده:

زمینه و هدف: گلووتاریک اسید یوریک نوع ۱ نوعی اختلال متابولیکی عصبی می باشد که در اثر جهش در ژن رمز کننده آنزیم گلووتاریل کوآدهیدروژناز (GCDH) ایجاد می شود. اصولاً تعیین توالی به منظور شناسایی جهش های نقطه ای و دیگر تنوعات توالی موجود در این ژن استفاده می شود که بسیار وقت گیر و پرهزینه می باشد. روش دیگر بررسی پیوستگی با استفاده از مارکرهای چند شکلی مانند چند شکلی های تک نوکلئوتیدی (SNP) است که برای تعیین افراد ناقل و همچنین تشخیص پیش از تولد در خانواده های دارای فرد مبتلا به کار می رود. در پایگاه های داده تعداد زیادی از مارکرهای SNP برای ناحیه ژنی GCDH معرفی شده است. در مطالعه حاضر خصوصیات و همچنین اطلاع دهنده گی مارکر rs9384 واقع در ناحیه ژنی GCDH مورد بررسی قرار گرفت.

روش بررسی: مارکر rs9384 در ۱۰۰ فرد سالم غیر خویشاوند با روش ARMS PCR با بهره گیری از پرایمرهای جدید طراحی شده تعیین ژنوتیپ شد. در این مطالعه تخمین فراوانی آللی و درجه هتروزیگوسیتی با استفاده از پایگاه GenePop انجام شد؛ همچنین از نرم افزار Power Marker برای تخمین وجود تعادل هاردی واینبرگ و میزان محتوی اطلاع دهنده گی چند شکلی (PIC) استفاده شد.

یافته ها: نتایج حاصل از این مطالعه بیانگر فراوانی آللی مینور (MAF) ۰/۳۴٪، درجه هتروزیگوسیتی ۰/۵۳٪ و مقدار PIC=۰/۳۵ برای مارکر rs9384 در جمعیت مورد مطالعه بود. به علاوه بررسی تعادل هاردی واینبرگ نشان داد که جمعیت برای این مارکر در تعادل می باشد.

نتیجه گیری: در مجموع با توجه به نتایج به دست آمده از مطالعه حاضر می توان مارکر rs9384 را به عنوان یک مارکر تک نوکلئوتیدی مناسب جهت تشخیص مولکولی گلووتاریک اسید یوریک نوع ۱ در جمعیت اصفهان به عنوان نمونه ای از جمعیت ایرانی معرفی کرد.

واژه های کلیدی: گلووتاریل کوآدهیدروژناز، چند شکلی تک نوکلئوتیدی، پیوستگی ژنتیکی.

مقدمه:

GA1 در حدود ۱ در ۱۰۰۰۰۰-۳۰۰۰۰ نوزاد در سراسر جهان می باشد (۳). گلووتاریل کوآدهیدروژناز GCDH متعلق به خانواده ی آسیل کوآدهیدروژناز از فلاووپروتئین های میتوکندریایی است. به طور ویژه GCDH مسئول دهیدروژناز و دکربوکسیلاز، گلووتاریل کوآ به کروتونیل کوآ و دی اکسید کربن در مسیر تجزیه ی L- لیزین، L- هیدروکسی لیزین و L- تریتوفان می باشد (۴). آنزیم فعال GCDH به عنوان

گلووتاریک اسیدیوریای (Glutaricaciduria) نوع ۱ (GA1) نوعی اختلال آتوزومی مغلوب است که در اثر نقص در ژن رمز کننده گلووتاریل کوآدهیدروژناز (GlutarylCoA Dehydrogenase) که یک آنزیم میتوکندریایی است، ایجاد می شود. بیماران (GA1) مستعد به توسعه اینسفالوپاتیک هستند که منجر به اختلالات و ناتوانایی های حرکتی دیستونیک (dystonic) غیر قابل برگشت خواهد شد (۲،۱). شیوع

هموترامر در ماتریکس میتوکندری وجود دارد. نقص و جهش در این آنزیم (GCDH) باعث اختلال در مسیر کاتابولیکی این اسیدهای آمینه و محصولات واسطه آن ها شده و در نتیجه تولید غیر طبیعی این مواد، تجمع اسید گلووتاریک و ۳- هیدروکسی گلووتاریک اسید و کاهش گلووتاریک کارنیتین ثانویه را در ادرار و مایعات بدن در پی خواهد داشت که در نهایت به سیستم عصبی آسیب خواهد رساند (۵، ۶). این وضعیت تحت تأثیر فشارهای عصبی و استرس تشدید خواهد شد. موقعیت این ژن روی بازوی کوتاه کروموزوم شماره ۱۹ (19p13.2) و امتداد آن بیش از ۷ kb و شامل ۱۱ اگزون و ۱۰ اینترون می باشد. کوتاه ترین اینترون در انسان اینترون شماره ۱ با ۹۱ جفت باز و بلندترین آن اینترون شماره ۵ با ۵/۲ kb است (۷، ۸). cDNA این ژن شامل ۴۳۸ اسید آمینه می باشد که بعد از ورود به ماتریکس میتوکندری ۳۹۴ واحد عملکردی آن باقی می ماند و جرم مولکولی آن ۳/۴۳ kD می باشد (۹). بیش از ۱۵۰ جهش در GCDH شناسایی شده که باعث GA1 در جمعیت سرتاسر جهان می شود. در بسیاری از این جهش ها یک اسید آمینه جایگزین اسید آمینه دیگر خواهد شد. شایع ترین جهش در این بیماری در مناطق اروپایی و سفیدپوستان R402W است. بسیاری از این جهش ها مربوط به مکان هایی است که توانایی متیله شدن دارند و به عنوان مناطق داغ جهشی شناخته شده اند (۱۰). Keyser و همکاران دریافتند که بیان جهش های R402W و R138G و E414K در ژن GCDH منجر به فقدان کامل فعالیت آنزیمی می شود؛ همچنین در اثر جهش M263V تخریب سریع میتوکندریای داخلی (Intramitochondrial) را باعث داشت (۱۲). یکی از روش های سریع و کارآمد برای تشخیص جهش ها در ژن GCDH استفاده از DGGE یا الکتروفورز ژل گرادیان تجزیه است که در واقع یکی از روش های معمول تشخیص مولکولی GA1 می باشد. با استفاده از این روش، جهش در هر ۲ آلل در افراد مبتلا به کمبود GCDH تأیید می گردد (۱۱). روش جایگزین برای تشخیص ژنتیکی

بر اساس بررسی غیر مستقیم جهش ها یا آنالیز پیوستگی با استفاده از مارکرهای چند شکلی متصل به ژن می باشد. مارکرهای چند شکلی تک نوکلئوتیدی (SNP= Single nucleotide polymorphism) شایع ترین چند شکلی ها در ژنوم انسان هستند و تخمین زده می شود که به طور متوسط در هر فاصله ۲۹۰ bp در ژنوم وجود دارند (۱۳). هر SNP نشان دهنده یک تغییر تک نوکلئوتیدی در ژنوم است و در اکثر موارد حالت ۲ آللی دارد. یک جایگاه تک نوکلئوتیدی معمولاً زمانی به عنوان یک SNP در نظر گرفته می شود که فراوانی آللی مغلوب آن در جمعیت ۱٪ یا بیشتر باشد. چند شکلی های تک نوکلئوتیدی مزایای شناخته شده و قابل توجه بسیاری در آنالیز پیوستگی دارد که از جمله آن ها می توان به شمار زیاد، پراکندگی، پایداری، پیوستگی شدید و حتی سرعت و توان بالای سیستم های تعیین SNP اشاره کرد (۱۴). در آنالیز پیوستگی به منظور بررسی انتقال آلل های جهش یافته در خانواده های دارای فرزند مبتلا، به مارکرهای اطلاع دهنده (گویا) نیاز است. یکی از ویژگی های مهم یک مارکر اطلاع دهنده این است که هتروزیگوتی آن بالا باشد. فراوانی آللی و درجه هتروزیگوتی مارکرهای چند شکلی معمولاً در جمعیت های مختلف متفاوت است؛ بنابراین برای شناسایی افراد ناقل و تشخیص پیش از تولد به روش غیر مستقیم، مارکرهای مورد استفاده بایستی در جمعیت تحت مطالعه به طور جداگانه بررسی شوند.

با توجه به این که تاکنون هیچ مطالعه ای مبنی بر بررسی مارکر rs9384 در ناحیه ژنی GCDH در ایران و خصوصاً در جمعیت اصفهان انجام نشده است، این مطالعه انجام شد. در پایگاه های داده های ژنتیکی (Genetic databases) انواع مارکرهای چند شکلی برای ناحیه ژنی GCDH معرفی شده است. از بین مارکرهای چند شکلی موجود، rs9384 در ناحیه ۳' UTR به علت پیوستگی به ژن و همچنین درجه بالای هتروزیگوسیتی که در پایگاه های مزبور گزارش شده است. برای مطالعه انتخاب شد. در این مطالعه خصوصیات و اطلاع دهندگی

این مارکر در جمعیت اصفهان به عنوان نمونه ای از جمعیت ایران مورد بررسی قرار گرفته است که نتایج آن می تواند در تشخیص های پیش از تولد گلو تاریک اسید یوربای نوع ۱ وابسته به ژن GCDH و همچنین تقویت اطلاعات ساختاری ژنتیکی جمعیت ایران مورد استفاده قرار گیرد.

روش بررسی:

در این مطالعه نمونه های خون از تعداد ۱۰۰ فرد سالم و غیر خویشاوند از جمعیت اصفهان جمع آوری شدند. پس از کسب رضایت نامه کتبی از همه افراد شرکت کننده در مطالعه، مقدار ۱۰ میلی لیتر از خون محیطی این افراد برای استخراج DNA نمونه گیری و برای جلوگیری از لخته شدن خون در لوله حاوی ۱ میلی لیتر EDTA با غلظت ۰/۵ مولار نگهداری شد. DNA از سلول های لوکوسیت خون به روش نمک اشباع استخراج گردید و سپس کمیت و کیفیت آن توسط دستگاه اسپکتروفتومتر بررسی شد (۱۵).

کلیه مارکرهای SNP موجود در ناحیه ژنی GCDH توسط نرم افزار Haploview و پایگاه داده UCSG Genome browser مورد بررسی قرار گرفتند (۱۶).

در نهایت مارکر rs9384 به علت نزدیکی به ژن و همچنین درجه بالای هتروزیگوسیتی در ناحیه ی ۳'UTR برای مطالعه در جمعیت اصفهان انتخاب شد.

در این تحقیق برای تعیین ژنوتیپ مارکر از روش ARMS PCR= Amplification Refractory system-PCR برای تعیین ژنوتیپ مارکر استفاده شد. این روش برای تشخیص موتاسیون های نقطه ای به کار می رود. این تکنیک در ۲ لوله جداگانه انجام می شود. ۱ لوله حاوی پرایمر رفت برای آلل طبیعی به اضافه پرایمر برگشت و کنترل و لوله دوم حاوی پرایمر رفت برای آلل جهش یافته به اضافه برگشت و کنترل می باشد. چنانچه تکثیر در لوله حاوی پرایمر موتاسیون یافته انجام شود، در DNA هدف، موتاسیون اتفاق افتاده است (هموزیگوت معیوب) و تکثیر در لوله حاوی پرایمر معمولی، نشان دهنده آن است که موتاسیون اتفاق نیافتاده است (هموزیگوت سالم) و اگر تکثیر در ۲ لوله وجود داشته باشد یعنی هم آلل طبیعی و هم آلل جهش یافته است (هتروزیگوت).

در این مطالعه پرایمرهای مزبور با استفاده از نرم افزارهای Primer1 و Oligo طراحی شدند. توالی پرایمرها، اندازه محصول PCR و دمای بهینه برای هر پرایمر در جدول شماره ۱ آورده شده است.

جدول شماره ۱: توالی، طول و دمای بهینه اتصال پرایمرهای طراحی شده برای مارکر rs9384

SNP	Code	Primer (3'-5')	Length	Tm
Rs9384	FG9384	CTTGAGAGGAGAGTGACGTG	۲۰	۵۶
	FT9384	CTTGAGAGGAGAGTGACGTT	۲۰	۵۸/۶
	RO9384	TCTGTGGCTGAAACTACTTCTC	۲۲	۵۷/۲
	FC9384	ATGTGTTCCCTTAAAAAGAAGATGG	۲۴	۵۶/۲

PCR، ۱۰ پیکومول از هر پرایمر به همراه آنزیم Taq DNA Polymerase، dNTP mix و بافر استفاده

محلول واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر به صورت زیر تهیه شد: در هر واکنش استاندارد

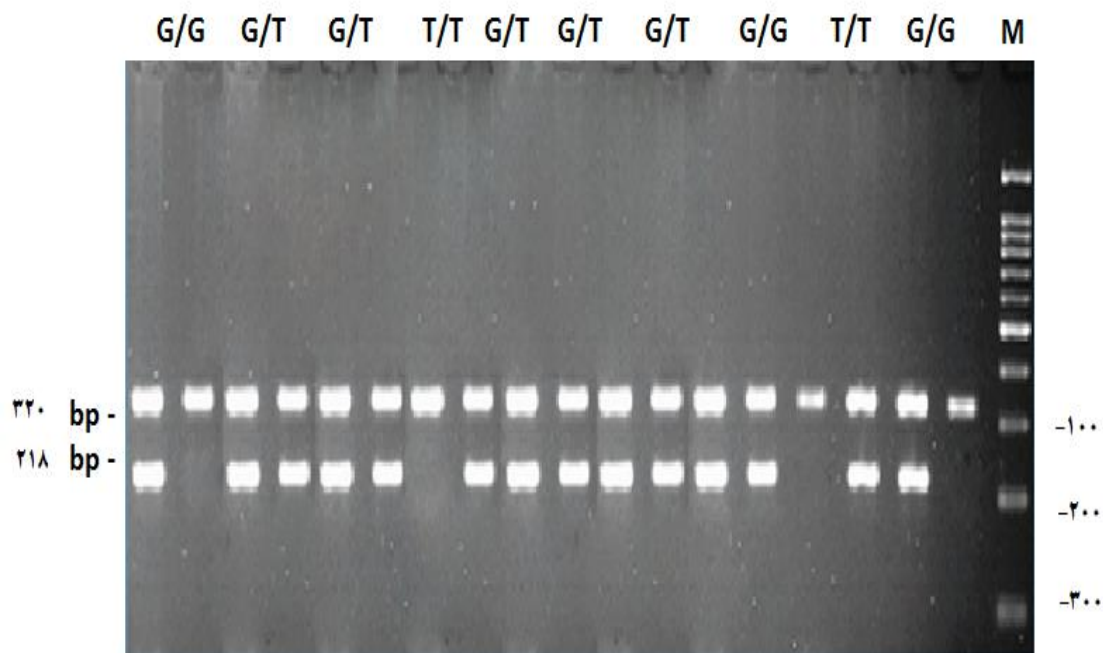
شد. واکنش‌های PCR بر روی نمونه‌های DNA ژنومی توسط دستگاه ترموسایکلر (Eppendorf, Germany) طبق شرایط بهینه شده زیر انجام شد: ۵ دقیقه دمای واسرشت اولیه در 94°C و سپس به دنبال آن ۳۱ چرخه متوالی از دمای واسرشت در 94°C (۴۰ ثانیه)، دمای اتصال پرایمری در 61°C (۵۰ ثانیه) و دمای تکثیر قطعات در 72°C (۵۰ ثانیه) انجام شد. در نهایت به منظور تکمیل فرآیند تکثیر قطعات دمای 72°C به مدت ۱۰ دقیقه اعمال شد. محصولات تکثیر شده بر روی ژل آگارز ۲٪ به مدت ۴۵ دقیقه در ولتاژ ۸۰W رانده شدند. ژل به دست آمده با اتیدیوم برماید رنگ آمیزی گردید و باندهای مربوطه با استفاده از دستگاه Gel documentation (Biometra) زیر نور UV مورد بررسی قرار گرفتند.

معمول ترین معیار اندازه گیری تنوع ژنتیکی در یک جمعیت، مقدار هتروزیگوسیتی است. افراد در گونه‌های دیپلوئید در یک لوکوس هموزیگوت یا هتروزیگوت هستند. وجود هتروزیگوسیتی نشان دهنده وجود تنوع ژنتیکی است. تخمین فراوانی آللی، درجه هتروزیگوسیتی و فراوانی ژنوتیپی مشاهده شده و مورد انتظار فنوتیپ‌های هموزیگوت و هتروزیگوت با استفاده از پایگاه GenePop انجام شد (۱۷)؛ همچنین پس از تخمین فراوانی‌های آللی و ژنوتیپی داده‌ها، وجود تعادل هاردی وینبرگ (HWE= Hardy-Weinberg Equilibrium) با استفاده از نرم افزار Power marker مورد بررسی قرار گرفت. تعادل هاردی وینبرگ بیان می‌کند که در جمعیتی با جفت گیری تصادفی بدون انتخاب، جهش، یا مهاجرت فراوانی‌های آللی، فراوانی‌های ژنوتیپی از نسلی به نسل دیگر ثابت هستند (۱۸). این نرم افزار بر اساس آزمون دقیق فیشر به بررسی تعادل هاردی وینبرگ می‌پردازد. در نهایت با استفاده از همین نرم افزار میزان فاکتور ظرفیت اطلاعاتی چند شکلی (Polymorphic information content) مورد مطالعه

قرار گرفت. فاکتور PIC معیاری برای تعیین میزان اطلاع دهنده‌گی مارکرهای چند شکلی است. این فاکتور برای مارکرهایی که دارای تعادل هاردی- وینبرگ در جمعیت می‌باشند، تعریف می‌شود که به تعداد و فراوانی آلل‌ها و درجه هتروزیگوسیتی مشاهده شده در جمعیت وابسته است (۱۹).

یافته‌ها:

مارکر ژنتیکی rs9384 در ناحیه ژنی GCDH در یک گروه از افراد سالم در جمعیت اصفهان مورد بررسی قرار گرفت. این مارکر یک چند شکلی تک نوکلئوتیدی (SNP) است که در ناحیه 3'UTR ژن GCDH قرار دارد و دارای ۲ آلل غالب G و آلل مغلوب T می‌باشد؛ بنابراین ژنوتیپ‌های GT، TT و GG در جمعیت مورد انتظار می‌باشند. نمونه‌های DNA افراد سالم و غیر خویشاوند با استفاده از پرایمرهای اختصاصی و روش ARMS PCR و الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۲٪ تعیین ژنوتیپ شدند. ۲ باند با طول‌های متفاوت ۳۲۰ و ۲۱۸ جفت باز بر روی ژل آگارز تفکیک شد. قطعه‌ی بزرگ ۳۲۰ جفت بازی نشان دهنده باند کنترل و صحت انجام واکنش PCR است که در تمامی ستون‌ها باید مشاهده شود و قطعه کوچک ۲۱۸ جفت بازی نشان دهنده آلل طبیعی یا جهش یافته است. حال اگر این قطعه ۲۱۸ جفت بازی در ستون مربوط به آلل طبیعی G باشد، فرد هموزیگوت سالم (GG) و اگر در ستون مربوط به آلل نادر T باشد، فرد هموزیگوت جهش یافته (TT) و در نهایت اگر قطعه هم درستون مربوط به آلل G و هم در ستون مربوط به آلل T باشد، فرد هتروزیگوت (GT) می‌باشد. پس افراد هموزیگوت غالب و مغلوب تنها دارای باند کنترل و یکی از ۲ باند اختصاصی آلل هستند؛ در حالی که افراد هتروزیگوت دارای همه باندها (کنترل و غالب و مغلوب) می‌باشند (تصویر شماره ۱).



تصویر شماره ۱: محصولات PCR برای مارکر rs9384 بر روی ژل آگارز ۲٪ با استفاده از روش ARMS PCR

جدول شماره ۲: افراد مشاهده شده و مورد انتظار در

هر ژنوتیپ در مارکر rs9384

ژنوتیپ ها	ژنوتیپ های مشاهده شده	ژنوتیپ های مورد انتظار
GG	۳۹	۴۲/۷۸
GT	۵۳	۴۵/۴۲
TT	۸	۱۱/۷۸

همان طور که در جدول شماره ۳ نشان داده شده است. فراوانی مشاهده شده برای آلل های غالب و مغلوب به ترتیب ۰/۶۵٪ و ۰/۳۴٪ بودند؛ همچنین درصد هتروزیگوسیته و هموزیگوسیته مشاهده شده برای اصفهان به ترتیب ۵۳٪ و ۴۷٪ بودند. این در حالی است که درصد هتروزیگوسیته و هموزیگوسیته مورد انتظار برای جمعیت اصفهان ۴۵/۴۲٪ و ۵۴/۵۷٪ به دست آمدند.

برای هر فرد ۲ ستون در نظر گرفته شده است. در همه ستون ها باند ۳۲۰ جفت بازی نشان دهنده کنترل داخلی است. باندهای اختصاصی ۲۱۸ جفت بازی بسته به این که حامل کدام پرایمر، (سالم G) یا (جهش یافته T) باشند، در ستون متفاوتی نشان داده شده اند. ستون اول از سمت راست، مارکر جهت تعیین اندازه باندها می باشد. ستون دوم و سوم از سمت راست مربوط به یک فرد هموزیگوت (GG) می باشد. ستون چهارم و پنجم از سمت راست مربوط به یک فرد هموزیگوت (TT) می باشد و ستون ششم و هفتم از سمت راست مربوط به یک فرد هتروزیگوت (GT) است و به همین ترتیب تا آخر به این صورت می باشد.

تعیین ژنوتیپ افراد تحت مطالعه نشان داد که ۳۹ نفر دارای ژنوتیپ G/G، ۵۳ نفر دارای ژنوتیپ G/T و ۸ نفر نیز دارای ژنوتیپ T/T بودند. فراوانی مربوط به این ژنوتیپ ها در جدول شماره ۲ نشان داده شده است.

جدول شماره ۳: فراوانی آللی و درصد هتروزیگوسیتی و هموزیگوسیتی مارکر rs9384

آللی پلی مورفیسم	فراوانی آللی (%)	هتروزیگوسیتی		هموزیگوسیتی	
		مشاهده شده (%)	مورد انتظار (%)	مشاهده شده (%)	مورد انتظار (%)
آل T	۰/۶۵	۵۳	۴۵/۴۲	۴۷	۵۴/۵۷
آل G	۰/۳۴	۵۳	۴۵/۴۲	۴۷	۵۴/۵۷

در پایان فراوانی آلل T به عنوان آلل مینور (MAF) در جمعیت ایران با سایر جمعیت های مورد بررسی قرار گرفت (جدول شماره ۴).

جدول شماره ۴: مقایسه فراوانی آلل T مربوط به مارکر rs9384 در جمعیت ایرانی با سایر جمعیت ها

جمعیت	rs9384
آفریقا	۳۳/۱۳
اروپا	۳۶/۰۶
چین	۱۴/۸۸
چین تایپه	۱۵/۲۹
تگزاس	۲۶/۱۴
ژاپن	۱۶/۸۶
کنیا (لوهیا)	۲۶/۱۱
کنیا (ماسایی)	۲۶/۶۱
ایتالیا	۳۱/۲۵
نیجریه	۲۳/۰۵
ایران	۳۴
مکزیک	۵۳/۲۵
میانگین	۲۷/۵۳

با استفاده از نرم افزار Power Marker، تعادل هاردی واینبرگ برای مارکر ژنتیکی rs9384 در جمعیت اصفهان مورد بررسی قرار گرفت. وجود تعادل هاردی واینبرگ از طریق محاسبه P بر اساس آزمون دقیق فیشر مورد بررسی قرار گرفت. در صورتی که مقدار P کوچک تر از ۰/۰۵ به دست آید، فرضیه صفر مبنی بر وجود تعادل هاردی واینبرگ برای لوکوس مورد نظر رد می شود. نتایج به دست آمده از آزمون دقیق فیشر نشان داد که مقدار P برای جمعیت اصفهان ۰/۰۷۱۷ است. این مقدار P بزرگ تر از ۰/۰۵ است که بیانگر وجود تعادل هاردی واینبرگ برای این مارکر در جمعیت اصفهان است. در نهایت با وجود تعادل هاردی واینبرگ مقدار PIC برای مارکر ژنتیکی rs9384 بررسی شد. بررسی ها نشان می دهد که PIC > ۰/۲۵ می تواند به عنوان یک شاخص مناسب برای گویا بودن یک مارکر تک نوکلئوتیدی در نظر گرفته شود. نتایج به دست آمده از مطالعه حاضر نشان داد که مقدار PIC برای مارکر rs9384 در جمعیت اصفهان ۰/۳۴۹۸ می باشد که نشان دهنده اطلاع دهندگی بالای آن به عنوان یک مارکر تک نوکلئوتیدی در جمعیت اصفهان است.

بحث:

توسط پایگاه داده International HapMap Project از طریق نرم افزار Haploview ارائه شده است. بر اساس گزارشات این پایگاه مشخص شده است که بیشترین فراوانی آلل مینور (MAF) T برای مارکر rs9384 مربوط به جمعیت مکزیک می باشد. این در حالی است که جمعیت چین در مقایسه با سایر جمعیت ها دارای فراوانی آلل مغلوب کمتری می باشد. مقایسه نتایج به دست آمده از این مطالعه با اطلاعات موجود در پایگاه داده International HapMap Project نشان می دهد که فراوانی آلل T مارکر rs9384 در نمونه ای از جمعیت ایران (جمعیت اصفهان) نسبت به جمعیت های مکزیک و اروپا کمتر است (جدول شماره ۴).

مشخص شده است که انحراف از تعادل هاردی واینبرگ می تواند صحت بررسی های آماری را تحت تأثیر قرار دهد. از این رو پس از تعیین فراوانی آللی و ژنوتیپی افراد، در مرحله بعد، وجود تعادل هاردی واینبرگ مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل نشان داد که تعادل هاردی واینبرگ برای مارکر rs9384 در جمعیت اصفهان وجود دارد.

نتیجه گیری:

در مجموع این مطالعه به منظور تعیین خصوصیات مارکر rs9384 در جمعیت اصفهان انجام گرفت و نتایج حاصل نشان داد که این مارکر با درجه هتروزیگوتی ۵۳٪ و فراوانی آللی ۳۴٪ (MAF > ۰/۲) و همچنین مقدار $PIC = ۰/۳۴۹۸$ ($PIC > ۰/۲۵$) می تواند به عنوان یک مارکر تک نوکلئوتیدی اطلاع دهنده در تشخیص غیر مستقیم آلل های جهش یافته ژن GCDH در خانواده های مبتلا به GA1 مورد استفاده قرار گیرد. از سوی دیگر اطلاعات به دست آمده از این مطالعه می تواند در تقویت اطلاعات ساختاری ژنتیکی جمعیت ایران مؤثر باشد. با توجه به نتایج به

گلو تاریک اسید یورای نوع ۱ (GA1) یک اختلال متابولیکی عصبی ارثی است که به وسیله ی جهش در ناحیه ی ژنی، ژن رمز کننده آنزیم میتو کندریایی گلو تاریل کوآهیدروژناز (GCDH) ایجاد می شود. اصولاً تشخیص مولکولی این بیماری با استفاده از روش مستقیم و بررسی جهش های مسبب بیماری انجام می شود. از این رو با توجه به تعداد زیاد جهش های شناخته نشده راهبرد اساسی برای تشخیص ژنتیکی بیماری بر پایه بررسی های غیر مستقیم با استفاده از مارکرهای چند شکلی پیوسته با ژن می باشد. در سال ۲۰۰۷ آقای پومارس و همکاران استفاده از SNP را برای انجام بررسی های غیر مستقیم جهت شناسایی افراد ناقل و تشخیص پیش از تولد پیشنهاد کردند. استفاده از SNP برای بررسی های غیر مستقیم به علت پایداری و همچنین پیوستگی شدید با ژن بسیار قابل اعتمادتر است. بررسی های غیر مستقیم با استفاده از مارکرهای چند شکلی موجود در ژن GCDH می تواند منجر به شناسایی آلل های جهش یافته این ژن شده و همچنین در تعیین افراد ناقل (هتروزیگوت) و تشخیص پیش از تولد در خانواده های مبتلا به GAI وابسته به GCDH مورد استفاده قرار گیرد. از بین مارکرهای موجود در ناحیه ژنی GCDH، مارکر rs9384 با توجه به جایگاه آن و فراوانی هتروزیگوسیته بالا انتخاب شد. فراوانی آللی و همچنین درجه هتروزیگوسیته این مارکر در جمعیت اصفهان مورد بررسی قرار گرفت و نتایج حاصل با اطلاعات مربوط به دیگر جمعیت ها مقایسه شد. نتایج به دست آمده از مطالعه حاضر بر روی مارکر rs9384 نشان می دهد که آلل G با فراوانی ۶۵٪ و آلل T با فراوانی ۳۴٪ به ترتیب بیشترین و کمترین فراوانی را در جمعیت اصفهان دارند؛ همچنین درصد هتروزیگوسیته مشاهده شده برای این مارکر نیز در جمعیت اصفهان ۵۳٪ می باشد که بیشتر از درصد هتروزیگوسیته مورد انتظار است.

فراوانی آللی برای مارکرهای چند شکلی این ناحیه ژنی به صورت اختصاصی برای جمعیت های مختلف

تشکر و قدردانی:

این مقاله مستخرج از پایان نامه با شماره ۲۲۱۹۵۱۸ در دانشگاه گیلان در تاریخ ۱۳۹۳/۱۱/۲۸ می باشد. صادق ولیان بروجنی و زیور صالحی به طور یکسان راهنمایی پایان نامه را به عهده داشته و سهم یکسانی در این مقاله دارند.

دست آمده از این تحقیق، می توان چند شکلی تک نوکلئوتیدی rs9384 را به عنوان یک مارکر گویا جهت تشخیص غیر مستقیم آلل های بیماری زای ژن GCDH (به عنوان ژن مرتبط با گلووتاریک اسید یوریک نوع ۱) در مطالعه مولکولی بیماری در جمعیت ایران معرفی نمود.

منابع:

- Schmiesing J, Schluter H, Ullrich K, Bräulke T, Muhlhausen C. Interaction of glutaric aciduria type 1-related glutaryl-CoA dehydrogenase with mitochondrial matrix proteins. *PLoS One*. 2014; 9(2): e87715.
- Goodman SI, Stein DE, Schlesinger S, Christensen E, Schwartz M, Greenberg CR, et al. Glutaryl-CoA dehydrogenase mutations in glutaric acidemia (type I): review and report of thirty novel mutations. *Hum Mutat*. 1998; 12(3): 141-4.
- Zinnanti WJ, Lazovic J, Housman C, LaNoue K, O'Callaghan JP, Simpson I, et al. Mechanism of age-dependent susceptibility and novel treatment strategy in glutaric acidemia type I. *J Clin Invest*. 2007; 117(11): 3258-70.
- Kolker S, Garbade SF, Greenberg CR, Leonard JV, Saudubray JM, Ribes A, et al. Natural history, outcome, and treatment efficacy in children and adults with glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency. *Pediatr Res*. 2006; 59(6): 840-7.
- Greenberg CR, Reimer D, Singal R, Triggs-Raine B, Chudley AE, Dilling LA, et al. A G-to-T transversion at the +5 position of intron 1 in the glutaryl CoA dehydrogenase gene is associated with the Island Lake variant of glutaric acidemia type I. *Hum Mol Genet*. 1995; 4(3): 493.
- Goodman SI, Kratz LE, DiGiulio KA, Biery BJ, Goodman KE, Isaya G, et al. Cloning of glutaryl-CoA dehydrogenase cDNA, and expression of wild type and mutant enzymes in *Escherichia coli*. *Hum Mol Genet*. 1995; 4(9): 1493-8.
- Biery BJ, Stein DE, Morton DH, Goodman SI. Gene structure and mutations of glutaryl-coenzyme A dehydrogenase: impaired association of enzyme subunits that is due to an A421V substitution causes glutaric acidemia type I in the Amish. *Am J Hum Genet*. 1996; 59(5): 1006-11.
- Kolker S, Christensen E, Leonard JV, Greenberg CR, Burlina AB, Burlina AP, et al. Guideline for the diagnosis and management of glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency (glutaric aciduria type I). *J Inher Metab Dis*. 2007; 30(1): 5-22.
- Kolker S, Boy SP, Heringer J, Muller E, Maier EM, Ensenaer R, et al. Complementary dietary treatment using lysine-free, arginine-fortified amino acid supplements in glutaric aciduria type I- A decade of experience. *Mol Genet Metab*. 2012; 107(1-2): 72-80.
- Zschocke J, Quak E, Guldborg P, Hoffmann GF. Mutation analysis in glutaric aciduria type I. *J Med Genet*. 2000; 37(3): 177-81.
- Keyser B, Muhlhausen C, Dickmanns A, Christensen E, Muschol N, Ullrich K, et al. Disease-causing missense mutations affect enzymatic activity, stability and oligomerization of glutaryl-CoA dehydrogenase (GCDH). *Hum Mol Genet*. 2008; 17(24): 3854-63.
- Morton DH, Bennett MJ, Seargeant LE, Nichter CA, Kelley RI. Glutaric aciduria type I: A common cause of episodic encephalopathy and spastic paralysis in the Amish of Lancaster County, Pennsylvania. *Am J Med Genet*. 1991; 41(1): 89-95.

13. Macdonald SJ, Pastinen T, Genissel A, Cornforth TW, Long AD. A low-cost open-source SNP genotyping platform for association mapping applications. *Genome Biol.* 2005; 6(12): R105.
14. Botstein D, Risch N. Discovering genotypes underlying human phenotypes: past successes for mendelian disease, future approaches for complex disease. *Nat Genet.* 2003; 33 Suppl: 228-37.
15. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 1988; 16(3): 1215.
16. Kruglyak L, Nickerson DA. Variation is the spice of life. *Nat Genet.* 2001; 27(3): 234-5.
17. Raymond M, Rousset F. GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *J Hered.* 1995; 86(3): 248-9.
18. Guo SW, Thompson EA. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics.* 1992; 48(2): 361-72.
19. Elahi E, Kumm J, Ronaghi M. Global genetic analysis. *J Biochem Mol Biol.* 2004; 37(1): 11-27.
20. Mbatchi LC, Schmitt A, Thomas F, Cazaubon Y, Robert J, Lumbroso S, et al. Polymorphisms in SLCO1B3 and NR1I2 as genetic determinants of hematotoxicity of carboplatin and paclitaxel combination. *Pharmacogenomics.* 2015; 16(13): 1439-50.
21. Bolduc V, Marlow G, Boycott KM, Saleki K, Inoue H, Kroon J, et al. Recessive mutations in the putative calcium-activated chloride channel Anoctamin 5 cause proximal LGMD2L and distal MMD3 muscular dystrophies. *Am J Hum Genet.* 2010; 86(2): 213-21.

Analysis of rs9384 polymorphic marker located in the GCDH gene region associated with glutaricaciduria type 1

Badr Z^{1,2*}, Salehi Z², Jazaeri A¹, Vallian S¹

¹Biology Dept., University of Isfahan, Isfahan, I.R. Iran; ²Biology Dept., University of Guilan, Rasht, I.R. Iran.

Received: 20/Sep/2015 Accepted: 23/Dec/2015

Background and aims: Glutaricaciduria type 1 (GA1) is an inherited neurometabolic disorder caused by mutations in the GCDH gene encoding glutaryl-CoA dehydrogenase (GCDH). Direct sequencing is usually used to detect point mutations and other sequence variations in the gene, which is expensive and time-consuming. Alternatively, linkage analysis of polymorphic markers such as single nucleotide polymorphism (SNP) has been used in heterozygous carrier detection and prenatal diagnosis of the disease in families with an affected individual. A large number of SNP markers have been introduced in the GCDH gene region in the electronic databases. In the present study, the characteristics of rs 9384 as an informative marker located in GCDH gene region were investigated.

Methods: Genotyping was carried out by ARMS PCR technique in 100 unrelated healthy individuals using newly designed primers. Estimation of allelic frequency and heterozygosity rate was performed using GenePop website and the presence of Hardy Weinberg Equilibrium (HWE) as well as the amount of polymorphism information content (PIC) was computed by Power Marker software for the marker.

Results: The results indicated 0.34% minor allele frequency (MAF), 0.53% heterozygosity rate and 0.3498% PIC for rs9384 marker in the population. Moreover, analysis of Hardy-Weinberg Equilibrium showed the presence of equilibrium for this marker in this population.

Conclusion: In total, according to the results of this study, rs9384 can be considered as an informative SNP marker for molecular diagnosis of GCDH related GA1 by indirect genetic analysis in the Isfahan population as a representative sample of the Iranian population.

Keywords: Glutaryl-CoA dehydrogenase, Single nucleotide polymorphism; Genetic Linkage.

Cite this article as: Badr Z, Salehi Z, Jazaeri A, Vallian S. Analysis of rs9384 polymorphic marker located in the GCDH gene region associated with glutaricaciduria type 1. J Shahrekord Univ Med Sci. 2016; 18(4): 57-66.

*Corresponding author:

Biology Dept., University of Isfahan, Isfahan, I.R. Iran. Tel: 00983137932456,
E-mail: svallian@sci.ui.ac.ir